

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830074

研究課題名(和文) 胃癌マウスモデルを利用した未分化型胃癌の新規エピジェネティクス治療薬の開発

研究課題名(英文) Targeting epigenetic alterations in a mouse model of E-cadherin/p53-deficient diffuse-type gastric cancer

研究代表者

島田 周 (Shimada, Shu)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20609705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：発症数と死亡数が多い胃癌の中でも未分化型胃癌(DGC)は特に予後が悪い。我々はヒトDGCに形態学的にも分子生物学的にもよく似た胃癌を発症する世界初のマウスモデル(DCKO)を作製し、その胃癌から初代培養細胞株(MDGC)を樹立することにも成功した。マイクロアレイ解析の結果より、DCKOマウスのDGCではエピジェネティクス変化が生じていると推測された。そこで、MDGC細胞株にエピジェネティクス治療薬を網羅的に処理することにより、スフェア形成を顕著に阻害する薬剤を複数同定した。それらの薬剤はin vivoでも腫瘍増殖抑制効果を示し、エピジェネティクス治療薬によるDGC治療の糸口が得られた。

研究成果の概要(英文)：Diffuse-type gastric cancer (DGC) exhibits rapid disease progression and a poor patient prognosis. We have established an E-cadherin/p53 double conditional knockout (DCKO) mouse line as the first genetically engineered one, which morphologically and molecularly recapitulates human DGC. In this study, we derived mouse DGC (MDGC) cell lines from primary tumors and lymph node metastases of the DCKO mice. We identified that the expression levels of epigenetic regulators and frequently methylated genes were up- and down-regulated in mouse primary DGC, respectively. Treatment with some epigenetic inhibitors could markedly induce differentiation and attenuate sphere formation of the MDGC cell lines in vitro. Moreover, these agents demonstrated enhanced tumor-suppressor activity in vivo. These results suggest that epigenetic alteration may play significant roles in diffuse-type gastric carcinogenesis and support to develop a relevant therapeutic strategy in human DGC.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：胃癌 マウスモデル E-cadherin p53 エピジェネティクス 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃がん

胃がんは世界的に発症数と死亡数が多く、日本においても同様である。胃がんは、組織学的に明瞭な腺管構造をもつ分化型とがん細胞が散在する未分化型 (DGC=diffuse-type gastric cancer) に大別される。その中でも、スキルス胃がんによって代表される DGC は、浸潤が強く進行が速い、リンパ節転移や腹膜播種が多い、しばしば手術不能である、抗がん剤が効きにくいなどの特徴があり、予後が極めて悪い難治がんの一つである。しかし、その発症機構の解明には至っておらず、有効な治療方法も確立されていない。

(2) 胃がんマウスモデル

我々はヒト DGC でその異常が報告されている細胞接着分子 E-cadherin (*Cdh1* 遺伝子がコードする) とがん抑制因子 p53 (*Trp53* 遺伝子がコードする) を胃特異的に欠損する (DCKO=double conditional knockout) マウスを作製した。DCKO マウスは、1年以内に100%の頻度で DGC を発症し、約半数が消化管出血や幽門部狭窄により死亡する、その DGC は強い浸潤能とリンパ節転移能をもち、免疫不全マウス皮下移植で腫瘍を形成する、上皮間葉転換 (EMT=epithelial-mesenchymal transition) 関連遺伝子の発現亢進が認められるという特徴を有していた。我々は、ヒト DGC に形態学的にも分子生物学的にも類似した胃がんを発症する世界初のマウスモデルとして DCKO マウスを報告した。

(3) マウス胃がん細胞株

我々は DCKO マウスの胃がん原発巣とリンパ節転移巣から細胞株を樹立することにも成功している。DCKO マウスの胃がん由来細胞株 (MDGC=*Cdh1*^{-/-}*Trp53*^{-/-} gastric cancer cell line) と、p53 ノックアウトマウス胎仔の胃粘膜上皮由来細胞株 (GIF=*Trp53*^{-/-} gastric epithelial cell line) を比較すると、MDGC 細胞株は GIF 細胞株よりも 30 倍以上強いスフェア形成能をもつ、ヌードマウスに皮下移植すると、MDGC 細胞株は 10² 個の細胞でも腫瘍を形成するのに対して、GIF 細胞株は 10⁵ 個の細胞でも腫瘍を形成しない、MDGC 細胞株は細胞傷害性の抗がん剤 (5-Fluorouracil・Paclitaxel) に対して強い耐性をもつことがわかった。

(4) エピジェネティクス治療薬

固形がんを含めて多くの悪性腫瘍は根治が未だ困難である。細胞傷害作用を利用した第1世代の抗がん剤や、チロシンキナーゼなどの細胞増殖シグナルを標的とした第2世代の抗がん剤には、がん幹細胞や、細胞増殖シグナルに依存しないがん細胞の存在などの問題点がある。がん幹細胞の性質の維持には、EMT やエピジェネティクス変化が重要な役割を果たしていることが知られてきている。

EMT を生じた KRAS 変異がん細胞株は KRAS シグナル経路に依存しないことや、EGFR 変異がん細胞株の中に存在するチロシンキナーゼ阻害薬に耐性をもつ細胞集団にはエピジェネティクス阻害薬が有効であることも報告されている。さらに、EMT を含む分化の可塑性もエピジェネティクス変化の結果であるという報告がある。以上の最新の知見より、新規抗がん剤としてエピジェネティクス治療薬の開発が有望であると考えられた。

2. 研究の目的

DCKO マウスの DGC では、ヒトの胃がん DNA メチル化などのエピジェネティクス変化が報告されている遺伝子群の発現低下と、それらのエピジェネティクス変化を制御する遺伝子群の発現上昇が認められており、エピジェネティクスががん化に重要な役割を果たしていると推測された。そこで、我々が作製した胃がんマウスモデルとその胃がん由来細胞株を活用して、既存のどのエピジェネティクス治療薬が胃がんの治療に有効であるか解析し、ヒト胃がん患者への臨床応用を目指すことにした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

MDGC 細胞株と GIF 細胞株は、いずれもコラーゲンコートディッシュ上で Ham's F12 培地 +5% bovine serum または horse serum 内で培養した。

(2) 細胞増殖アッセイ

12 ウェルのコラーゲンコートプレートに各々 10⁴ 細胞/ウェルで播種し、24 時間後に薬剤を投与し、さらに 48 時間後に MTT を利用して細胞増殖を解析した。

(3) スフェア形成能アッセイ

24 ウェルの Ultra-low attachment プレートに各々 10³ 細胞/ウェルで播種し、Ham's F12 培地+EGF/FGF/insulin/hydrocortisone 内で 14 日間培養し、スフェア数を算定した。

(4) 皮下移植腫瘍形成能アッセイ

KSN ヌードマウスに各々 10⁵ 細胞/箇所 Matrigel と共に皮下注射し、14 日後に腫瘍径が 1cm 前後となったことを確認し、薬剤投与を開始した。

(5) RNA 抽出と cDNA 合成

RNA 抽出は TRIzol (Life Technologies) を、cDNA 合成は Super Script III (Life Technologies) を使用した。

(6) マイクロアレイ解析

DCKO マウスの胃がん原発巣 3 症例をサンプルとして、正常マウスの胃粘膜上皮 5 症例をプールしたものをコントロールとして、Whole Mouse Genome Microarray Kit 4x44k

(Agilent)を利用して解析した。

(7) RT-PCR

RT-PCRはTaq polymerase (Greiner)を、定量的RT-PCRはLightCycler 480 SYBR Green (Roche)を使用した。*Gapdh*遺伝子を内部コントロールとして解析した。

(8) メチル化特異的 PCR

Bisulfite 処理はMethylamp DNA Modification Kit (Epigentek)を使用した。

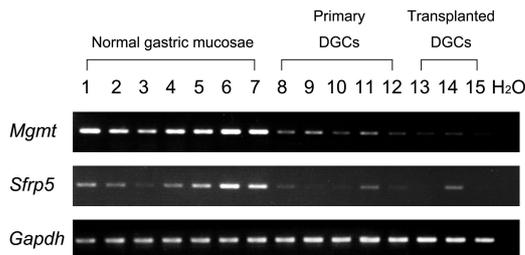
4. 研究成果

[結果]

(1) DCKO マウスの DGC のエピジェネティクス変化の解析

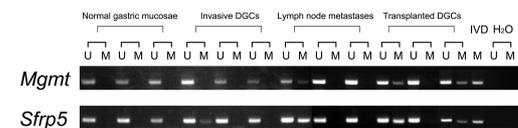
DCKO マウスの DGC のマイクロアレイ解析の結果より、DCKO マウスの DGC では、胃がんを含めた多くの悪性腫瘍で DNA メチル化が生じている遺伝子群の発現低下が認められた。実際に、*Mgmt* 遺伝子と *Sfrp5* 遺伝子については、RT-PCR 解析で発現低下 (図 2a) とメチル化特異的 PCR で DNA メチル化 (図 2b) が認められた。さらに、マイクロアレイ解析の結果より、エピジェネティクス変化を制御する遺伝子群の発現上昇が認められ、定量的 RT-PCR 解析で *Dnmt3b* 遺伝子、*Suv39h1* 遺伝子、*Ezh2* 遺伝子の発現が有意に上昇していることがわかった (図 2c)。

図 2a



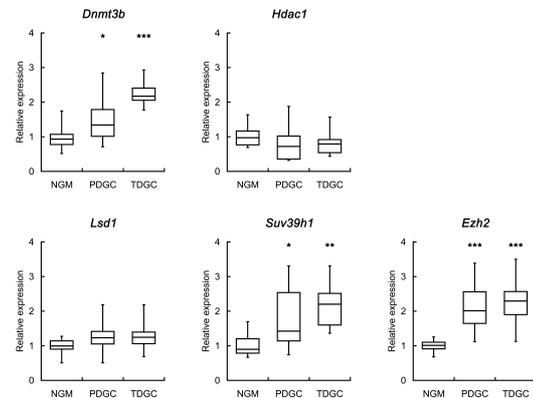
RT-PCR。マウスの正常胃粘膜 (Normal gastric mucosae) では高頻度メチル化遺伝子 *Mgmt* と *Sfrp5* が高発現しているのに対して、マウスの胃がん原発巣 (Primary DGCs) と移植腫瘍 (Transplanted DGCs) では発現が低下している。

図 2b



メチル化特異的 PCR。マウスの正常胃粘膜 (Normal gastric mucosae) 胃がん浸潤部 (Invasive DGCs) リンパ節転移巣 (Lymph node metastases) 移植腫瘍 (Transplanted DGCs) と悪性度が高くなるに従い、メチル化が認められる。U: 非メチル化、M: メチル化、IVD: メチル化コントロール。

図 2c

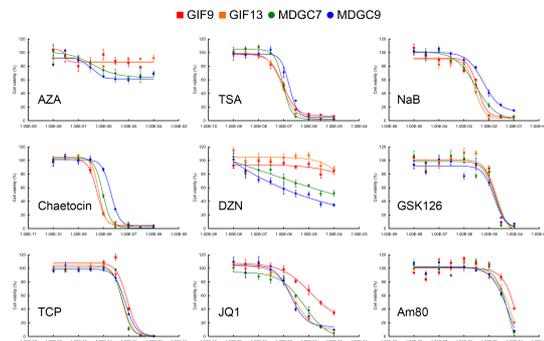


定量的 RT-PCR。エピジェネティクス制御遺伝子 *Dnmt3b*、*Suv39h1*、*Ezh2* は、マウスの正常胃粘膜 (NGM=normal gastric mucosae) 胃がん原発巣 (PDGC=primary DGCs) 移植腫瘍 (TDGC=transplanted DGCs) と悪性度が高くなるに従い、発現が亢進している。NGM: 13 症例、PDGC: 12 症例、TDGC: 7 症例。*: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 。

(2) 既存のエピジェネティクス治療薬のスクリーニング

MDGC 細胞株と GIF 細胞株に対して、DNA メチル化阻害剤 5-aza-dC (AZA) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 Trichostatin A (TSA) と Sodium butyrate (NaB) *Suv39h1* 阻害剤 Chaetocin、*Ezh2* 阻害剤 3-deazaneplanocin A (DZN) と GSK126、*Lsd1* 阻害剤 Tranylcypromine (TCP) *BRD4* 阻害剤 JQ1、ビタミン A 誘導体 Am80 などの既存のエピジェネティクス治療薬を処理した。その結果、AZA と DZN は MDGC 細胞株に対してのみ細胞増殖抑制を示し (図 3a)、TSA・NaB・DZN は MDGC 細胞株の形態変化を誘導した。さらに、各エピジェネティクス治療薬を低濃度 (IC_{80}) で処理してスフェア形成能アッセイを行ったところ、TSA・NaB・Chaetocin は顕著にスフェア形成を阻害し (図 3b) TSA・NaB 処理群では分化傾向を示唆する空胞をもつ細胞も認められた。

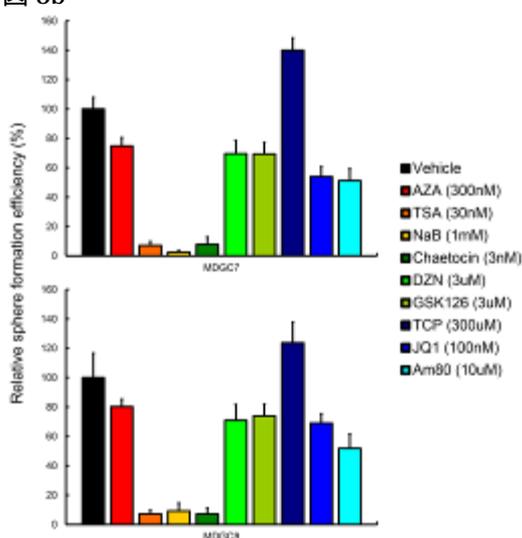
図 3a



エピジェネティック治療薬の用量反応曲線。AZA と DZN のみ IC_{50} が GIF 細胞株よりも MDGC 細胞株の方が低く、MDGC 細胞株特異的

に作用している可能性が高い。

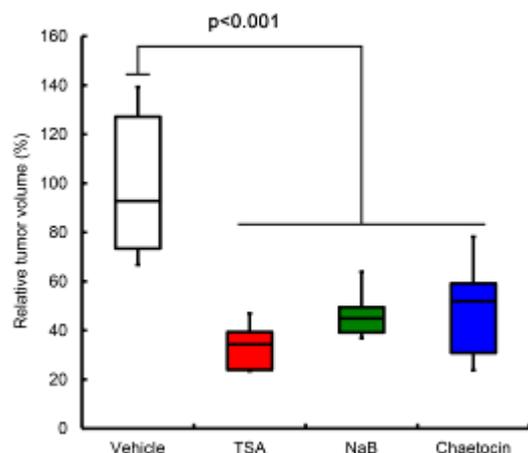
図 3b



(3) エピジェネティクス治療薬の in vivo での効果検証

MDGC 細胞株を皮下移植したヌードマウスに対して TSA・NaB・Chaetocin を腹腔内投与したところ、腫瘍増大が有意に抑制された (図 4)。

図 4



ヌードマウス皮下移植腫瘍形成能アッセイを利用したエピジェネティクス治療薬の評価。Vehicle (5% Dimethyl sulfoxide)、TSA (10mg/kg/day)、NaB (1200mg/kg/day)、Chaetocin (0.5mg/kg/day)、各 8 検体。

[考察]

我々は、DCKO マウスの DGC のマイクロアレイの結果に注目し、DGC の発症にエピジェネティクス異常が強く関与しており、DGC の治療にエピジェネティクス治療薬が有効であると推測した。実際、エピジェネティクス治療薬である TSA・NaB・Chaetocin は、in vitro でのスフェア形成を顕著に阻害し、in vivo でも腫瘍形成を有意に抑制した。以上より、DCKO マウスの DGC の治療にはエピジェネティ

クス制御が有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

英文査読あり

- (1) Furuyama T, Tanaka S, Shimada S, Akiyama Y, Matsumura S, Mitsunori Y, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Fukamachi H, Arii S, Kawaguchi Y, Tanabe M. Proteasome activity is required for the initiation of precancerous pancreatic lesions. *Scientific Reports*, 2016; 31(6):27044.
- (2) Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Shimada S, Akiyama Y, Aihara A, Matsumura S, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Fukamachi H, Tanaka H, Nakayama K, Arii S, Tanabe M. CD73 as a therapeutic target for pancreatic neuroendocrine tumor stem cells. *International Journal of Oncology*, 2016; 48(2):657-69.
- (3) Akiyama Y, Koda Y, Byeon SJ, Shimada S, Nishikawaji T, Sakamoto A, Chen Y, Kojima K, Kawano T, Eishi Y, Deng D, Kim WH, Zhu WG, Yuasa Y, Tanaka S. Reduced expression of SET7/9, a histone mono-methyltransferase, is associated with gastric cancer progression. *Oncotarget* 2015; 7(4):3966-83.
- (4) Akahoshi K, Tanaka S, Mogushi K, Shimada S, Matsumura S, Akiyama Y, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Arii S, Tanabe M. Expression of connective tissue growth factor in the livers of non-viral hepatocellular carcinoma patients with metabolic risk factors. *Journal of Gastroenterology*, in press.
- (5) Sakamoto A, Akiyama Y, Shimada S, Zhu WG, Yuasa Y, Tanaka S. DNA Methylation in the Exon 1 Region and Complex Regulation of Twist1 Expression in Gastric Cancer Cells. *PLoS ONE* 2015; 10(12):e0145630.
- (6) Ito H, Tanaka S, Akiyama Y, Shimada S, Adikrisna R, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Arii S, Yamaoka S, Tanabe M. Dominant expression of DCLK1 in human pancreatic cancer stem cells accelerates tumor invasion and metastasis. *PLoS ONE*, 2016; 11(1):e0146564.
- (7) Fukamachi H, Seol HS, Shimada S, Funasaka C, Baba K, Kim JH, Park YS, Kim

MJ, Kato K, Inokuchi M, Kawachi H, Yook JH, Eishi Y, Kojima K, Kim WH, Jang SJ, Yuasa Y. CD49^{high} cells retain sphere-forming and tumor-initiating activities in human gastric tumors. PLoS ONE, 2013; 8(8):e72438.

和文査読なし

(8) 島田 周, 田中 真二. 幹細胞に着目した新薬の可能性. 大腸がん perspective, 2016; 2(4):262-9.

〔学会発表〕(計 28 件)

28 件のうち、主要な 8 件のみを抜粋する。

- (1) Shimada S, Akiyama Y, Fukamachi H, Yuasa Y, Tanaka S. Identification of selective inhibitors of diffuse-type gastric cancer cells by screening of annotated compounds. 第 74 回日本癌学会総会, 2015 年 10 月 8 日~10 日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市).
- (2) Shimada S, Akiyama Y, Fukamachi H, Yuasa Y. Identification of selective inhibitors of mouse diffuse-type gastric cancer cells by screening a library of known drugs. 第 73 回日本癌学会総会, 2014 年 9 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- (3) Shimada S, Akiyama Y, Fukamachi H, Yuasa Y. Identification of selective inhibitors of mouse E-cadherin/p53-deficient diffuse-type gastric cancer cells by screening a library of known compounds. NRF A3 Foresight Program 2014 Seminar - Epigenetic Signatures in Gastric Carcinogenesis, 2014 年 6 月 20 日~23 日, ソウル, 韓国.
- (4) Shimada S, Akiyama Y, Fukamachi H, Kim WH, Yuasa Y. Identification of oncogenic pathways activated in a mouse model of E-cadherin/p53-deficient diffuse-type gastric cancer. JSPS A3 Foresight Program 2014 Seminar - Epigenetic Signatures in Gastric Carcinogenesis, 2014 年 3 月 14 日~17 日, ANA クラウンプラザホテル京都(京都府・京都市).
- (5) Shimada S. Targeting epigenetic alterations in a mouse model of E-cadherin/p53-deficient diffuse-type gastric cancer. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference (招待講演), 2013 年 12 月 16 日~18 日, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県・浦安市).
- (6) Shimada S, Akiyama Y, Fukamachi H, Yuasa Y. Epigenetic involvement in a

mouse model of E-cadherin/p53-deficient

diffuse-type gastric cancer. 第 72 回日本癌学会総会, 2013 年 10 月 3 日~15 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

- (7) 島田 周. びまん浸潤型胃癌マウスモデルにおけるエピジェネティクス変化の解析. 第 24 回日本消化器癌発生学会総会, 2013 年 9 月 5 日~6 日, 石川県立音楽堂(石川県・金沢市).
- (8) Shimada S, Akiyama Y, Fukamachi H, Yuasa Y. Targeting epigenetic alterations in a mouse model of E-cadherin/p53-deficient diffuse-type gastric cancer. NRF A3 Foresight Program 2013 Seminar - Epigenetic Signatures in Gastric Carcinogenesis, 2013 年 7 月 6 日~9 日, 扶余, 韓国.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/monc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 周 (SHIMADA Shu)

東京医科歯科大学

大学院医歯学総合研究科

助教

研究者番号: 20609705

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし